

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

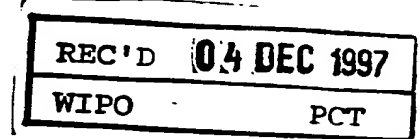
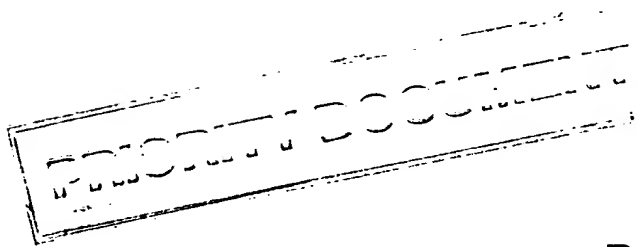
**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

EP 97/5783  
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

09/284787



**Bescheinigung**

Die Boehringer Mannheim GmbH in Mannheim/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Monoklonale Antikörper gegen das Epitop  
YPYDVPDYA, Verfahren zu deren Herstellung  
und Verwendung"

am 21. Oktober 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-  
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-  
bole C 07 K und A 61 K der Internationalen Patentklassifika-  
tion erhalten.

München, den 15. September 1997  
Der Präsident des Deutschen Patentamts  
Im Auftrag.

Wöhner



Zeichen: 196 43 314.2

## Monoklonale Antikörper gegen das Epitop YPYDVPDYA, Verfahren zu deren Herstellung und ihre Verwendung

Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen das Epitop YPYDVPDYA, das aus dem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus abgeleitet ist und die zum Nachweis und zur Isolierung von nativem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus, von modifiziertem Hämagglutinin oder von Hämagglutinin-Fusionsproteinen geeignet sind sowie eine Affinität  $> 10^8 \text{ M}^{-1}$ , insbesondere von  $10^9$  bis  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  aufweisen.

Hämagglutinine sind Substanzen - meist Glykoproteine - mit der Fähigkeit, Erythrocyten zu agglutinieren. Sie kommen u.a. als Bestandteile von Viren, wie z.B. in Myxoviren oder Pockenviren vor. Von besonderer Bedeutung ist das Hämagglutinin (HA) des Influenzavirus, einem membranumhüllten Virus mit einem (-) RNA-Genom. Das Influenza-Hämagglutinin ist ein transmembranales Oberflächenantigen, das in Form von Spikes aus der sphärischen Lipidhülle herausragt, wie man auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennen kann. Die HA-Spikes sind Trimere, deren Monomere aus zwei Polypeptidketten bestehen. HA1(46.000-65.000 D) und HA2(21.000-30.000 D). Das Hämagglutinin in der Membran des Influenzavirus ermöglicht es dem Virus, in empfängliche Wirtszellen, z.B. des Respirationstraktes, einzudringen.

Bekanntermaßen sind Antikörper gegen Hämagglutinin effektive Hemmer der Virusinfektion. Die spezifische Affinität des Antikörpers gilt im allgemeinen jedoch nicht für das gesamte makromolekulare Protein, sondern nur für ein spezielles Epitop.

Um Proteine zu analysieren, ist heute die Technik des Epitop-Taggings, d.h. das Anfügen eines Epitops an ein Protein durch molekularbiologische Techniken, eine häufig angewandte Methode und prinzipiell unabhängig vom verwendeten Epitop. Dabei wird die Primärsequenz eines beliebigen Proteins mit Hilfe rekombinanter Techniken um einige wenige Aminosäuren erweitert. Ausschlaggebend ist lediglich das Vorhandensein

eines spezifischen und hochaffinen Antikörpers mit bekannter Erkennungssequenz. Mit Hilfe von Antikörpern, die spezifisch gegen den erweiterten Proteinanteil gerichtet sind, bietet diese Methode die Möglichkeit, z.B. das Molekulargewicht eines Proteins, seine zelluläre Lokalisation, posttranslationale Modifizierungen oder Wechselwirkungen mit anderen Faktoren zu analysieren, ohne daß Protein-spezifische Antikörper vorhanden sein müssen.

Virale Epitope haben dabei gegenüber zellulären Epitopen den Vorteil, daß diese Proteinsequenzen in bakteriellen und eukaryontischen Proteinen in der Regel nicht vorkommen und damit keine Kreuzreaktionen in bakteriellen oder zellulären Systemen zu erwarten sind.

Ein häufig in der Literatur beschriebenes virales Epitop, das für derartige Analysen verwendet wird, ist aus dem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus abgeleitet. Dieses Epitop weist die Aminosäuresequenz YPYDVPDYA (98-106) auf (Field, J. et al (1988), Mol. Cell. Biol. Vol. 8, Nr. 5, 2159-2165 und Wilson et al., Cell 37, 767 - 778, 1984). Monoklonale Antikörper (mAK) gegen dieses Epitop sind beschrieben und verfügbar, so z.B. der mAK 12CA5 (P.A. Kolodziej und Young, R.A., Meth. Enzymol. (1991), Vol. 194, 508-519; Chen, Y.-T. et al (1993), Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 90, 6508-6512)) und der Anti-HA-BabCo.

Diese Antikörper besitzen jedoch den Nachteil, daß ihre Affinität nicht genügend hoch ist, was dazu führt, daß für eine sensitive Detektion entsprechender Fusionsproteine der Epitop-spezifische Antikörper in einer hohen Konzentration eingesetzt werden muß, wodurch unspezifische Wechselwirkungen hervorgerufen werden können, die z.B. als Kreuzreaktionen im Western-Blot deutlich werden (vgl. Chen et al., S. 6510).

Bedingt durch die unzureichende Affinität ist auch eine geringere Sensitivität der bekannten Anti-HA-mAK zu verzeichnen.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, monoklonale Antikörper gegen das virale Epitop YPYDVPDYA bereitzustellen, die eine höhere Affinität aufweisen und

die somit zu hochsensitiven Hämagglutinin-Nachweisen oder HA-Fusionsprotein-Nachweisen geeignet sind und reproduzierbare Ergebnisse liefern.

Erfindungsgemäß wurden monoklonale Antikörper bereitgestellt, die das Epitop mit der Aminosäuresequenz YPYDVPDYA (98-106) des Hämagglutinin des humanen Influenzavirus sowie entsprechende Fragmente hiervon erkennen und eine Affinität  $> 10^8 \text{ M}^{-1}$ , insbesondere von  $10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$  aufweisen. Unter Epitopfragmenten werden dabei insbesondere solche Aminosäuresequenzen verstanden, die mindestens 70% der Sequenz YPYDVPDYA entsprechen bzw. mindestens um ein bis zwei terminale Aminosäuren verkürzt sind.

Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper wurden Kleinsäuger, vorzugsweise Ratten, wie z.B. Lou/C-Ratten oder Mäuse, wie z.B. BalbC-Mäuse, oder Kaninchen, mit einem nach Standardmethoden synthetisierten HA-Peptid immunisiert. Es wird als Antigen ein ungekoppeltes HA-Peptid oder ein HA-Peptid, das gegebenenfalls über ein Carrier-Protein N- oder C-terminal gekoppelt ist oder ein HA-Fusionsprotein eingesetzt. Vorzugsweise wurden als Carrier-Proteine Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH) oder Bovines Serumalbumin (BSA) verwendet. Anschließend wurden B-Lymphozyten aus der Milz der Tiere isoliert und durch Zellfusion mit geeigneten Myelomzellen oder nach anderen an sich bekannten Verfahren, wie z.B. mittels Onkogene (Jonak, Z.L. et al, (1988) Adv. Drug Rev. 2:207-228) oder in einem elektrischen Feld (Zimmermann, U. (1982) Biochim. Biophys. Acta 694:227-277) immortalisiert. Erfindungsgemäß bevorzugt wurde die Zellfusion mit Milzzellen von Lou/C-Ratten und Myelomzellen der Linie Maus P3x63-Ag8,653 (Kearney, J.F. et al (1979), J. Immunol. 123, 1548-1550) durchgeführt.

Dabei werden die Lymphozyten und die Myelomzellen nach den bekannten Verfahren, insbesondere Polyethylenglykolfusion (PEG), Virus-Fusion oder Elektrofusion fusioniert und entstehende Hybridzellen (Zellklone) nach ebenfalls bekannten Verfahren, wie z.B. durch Einsatz von Selektionsmedien, selektiert.

So wurden positive Klone zunächst mit HA-Peptiden und dann mit HA-Fusionsproteinen getestet. In einem ersten Screen wurde ein biotinoyliertes HA-Peptid, z.B. Bio-C-HA (Acetyl-YPYDVDPDYAGSGSK( $\epsilon$ -Bionoyl)-Amid) oder Bio-N-HA (Biotinoyl- $\epsilon$ -Aca-SGSGYPYDVDPDYA-Amid), und in einem zweiten Screen eine HA-getaggte  
5 Glutathion-S-Transferase (GST) verwendet. Wiederum positive Klone wurden anschließend mit Hilfe der Plasmonresonanz in einem BiaCore-System auf ihre Affinität untersucht und selektioniert.

Die Hybridzellen wurden nach bekannten Verfahren kloniert, kultiviert und vermehrt  
10 und gegebenenfalls in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Als aktivste Zellklone mit stabiler Antikörperproduktion wurden die Zelllinien R 3F10, R 3A12 und R 6D12 etabliert. Das Hybridom R 3A12 wurde in der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b,  
15 38124 Braunschweig unter der Nummer DSM ACC2286 am 08.10.1996 hinterlegt.

Zur Antikörpergewinnung wurden die Hybridzellen in der Zellkultur oder gegebenenfalls in vivo durch Transplantation als Ascitestumore weitervermehrt. Die mAK wurden aus den Zellkulturüberständen oder gegebenenfalls aus der Ascitesflüssigkeit der tumortragenden Versuchstiere isoliert.  
20

Erfindungsgemäß werden die von den Hybridzellen in hoher Konzentration produzierten mAK, die sich durch ausgezeichnete Spezifizität und Bindungsstärke für das Epitop YPYDVDPDYA des Hämagglutinins des humanen Influenzavirus auszeichnen, erhalten.  
25 Sie ermöglichen den hochsensitiven Nachweis und die Isolierung von Hämagglutinin sowie von Proteinen, an die das HA-Epitop YPYDVDPDYA angefügt wurde.

Die Affinität der erfindungsgemäßen mAK liegt bei  $> 10^8 \text{ M}^{-1}$ . So erwies sich die Affinität des mAK 3F10 mit  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  ungefähr um das 30-fache höher als die der bekannten Antikörper 12CA5 ( $10^8 \text{ M}^{-1}$ ) und BabCo ( $10^7 \text{ M}^{-1}$ ).  
30

Die Affinität der erfindungsgemäßen mAK 3A12 und 6D12 beträgt  $10^9 \text{ M}^{-1}$  und liegt damit ebenfalls über der der bekannten Antikörper. Die erfindungsgemäßen mAK sind

in wesentlich geringeren Konzentrationen einsetzbar und Kreuzreaktionen sind nahezu auszuschließen. Sie ermöglichen eine verbesserte Sensitivität der Detektion. Es zeigte sich, daß sie sowohl natives HA des Influenzavirus, modifiziertes HA als auch HA-Fusionsproteine erkennen. Sie sind somit in an sich bekannten Nachweisreaktionen, wie  
 5 z.B. dem Festphasen-Zwei-Seiten-Bindungstest zur Bestimmung von Proteinen sehr gut einsetzbar.

Anschließend wird die Erfindung an folgenden Ausführungsbeispielen näher erläutert.

#### Beispiel 1:

##### Herstellung der Klone R 3F10, R 3A12 und R 6D12

#### 15 HA-Peptid-Herstellung

Folgende Peptide wurden synthetisiert:

Bio-C-HA (Acetyl-**YPYDVDPDY**AGSGSK( $\epsilon$ -Biotinoyl)-Amid)

Bio-N-HA (Biotinoyl- $\epsilon$ -Aca-SGSG**YPYDVDPDY**A-Amid)

20 KLH-MPS-CUZU-HA-C

KLH-MPS-CUSU-HA-N

#### Immunisierung von Kleinsäugern

25 Lou/C-Ratten wurden intraperitoneal mit KLH-gekoppeltem HA-Peptid nach folgendem Schema immunisiert:

Zu einer Grundimmunisierung der Tiere wurden 50  $\mu$ g KLH-gekoppeltes HA-Peptid in komplettem Freund'schen Adjuvans injiziert.

30

Weitere Immunisierungen wurden mit 50  $\mu$ g KLH-gekoppeltem HA-Peptid in inkomplettem Freund'schen Adjuvans durchgeführt.



## Fusion

Die sich anschließende Fusion der Milzzellen von den Lou/C-Ratten erfolgte mit Maus P3x63-Ag8,653 in Gegenwart von PEG nach Kremmer et al (1990) Hybridoma 9, 309-317.

## Durchführung der Selektion der Klone

### Screening-Schema:

#### 1. Screen

- Eine SA-beschichtete Mikrotiterplatte (MTP) wurde mit 1 µg/ml Bio-C-HA bzw. Bio-N-HA beschichtet,
- Hybridomaüberstände wurden unverdünnt verwendet und in die beschichtete MTP gegeben,
- die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe von Anti-Ratte-POD-Konjugat/TMB-Substrat.

#### 2. Screen

- Eine Maxisorb-MTP wurde mit HA-getaggtter GST (1 µl/ml in Carbonat-Puffer) beschichtet,
- die beim 1. Screen ausgewählten Hybridomaüberstände wurden wiederum unverdünnt verwendet und in die beschichtete MTP gegeben,
- die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe von Anti-Ratte-POD-Konjugat/TMB-Substrat.

#### 3./4. Screen

- Es wurden BiaCore-Messungen mit analoger Beschichtung durchgeführt.

## Ergebnis

Mit Hilfe der Plasmonresonanz in dem BiaCore-System wurden 5 Klone mit der höchsten Affinität und der längsten Halbwertszeit der Dissoziation selektioniert. Sie wurden mit R 3F10, R 3A12, R 6D12, R 4H10 und M5B9 bezeichnet. Die Affinität war nur geringfügig unterschiedlich in Abhängigkeit der biotinoylierten Position der Peptide (C- oder N-Terminus - vgl. Abb. 1).

Die Klone R 3F10, R 3A12 und R 6D12 wurden als Zelllinien etabliert. Sie zeigen ein gutes Wachstum und eine stabile Antikörperproduktion, wobei die produzierten Antikörper eine um den Faktor 10 bis 100 höhere Affinität als die monoklonalen Antikörper des Standes der Technik 12CA5 und Anti-HA BabCo aufweisen.

Abb. 1 zeigt die Affinitäten der erfindungsgemäßen mAK im Vergleich zu den mAK 12CA5 und Anti-HA BabCo.

## Beispiel 2

### Bestimmung der Affinitätskonstanten sowie der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation der produzierten Antikörper

Die Bestimmung der Affinitätskonstanten sowie der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation der produzierten Antikörper erfolgte mit BIAcore<sup>®</sup> der Firma Pharmacia Biosensor (BIA steht für Biospezifische Interaktions Analyse). Das Messprinzip beruht auf der "Surface Plasmon Resonance". Die Messung wird auf einem Biosensor, dem sog. Sensorchip durchgeführt. An den mit Streptavidin beschichteten Sensorchip wird das biotinylierte Peptid durch eine nichtkovalente, hochaffine Bindung gekoppelt. Über diesen Sensorchip wird eine Lösung des zu untersuchenden Antikörpers geleitet, wobei der Antikörper durch nichtkovalente Wechselwirkungskräfte an das immobilisierte Peptid gebunden wird.

Durch die Bindung der einzelnen Komponenten erhöht sich die Massendichte auf der Oberfläche des Sensorchips, die vom Gerät in ein proportionales Messignal umgewandelt wird. Aus der zeitlichen Änderung des Signals, dem Sensorgramm, lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation und daraus die Affinitätskonstante berechnen.

Die Antikörper-Peptid-Komplexe lassen sich ohne Beeinträchtigung der an die Oberfläche gebundenen Peptide mit einfachen Mitteln wieder ablösen, so daß an demselben Sensorchip weitere Bindungsexperimente unter identischen Randbedingungen durchgeführt werden können.

Zur Kopplung der biotinylierten Peptide an den Sensorchip (SA, Pharmacia Biosensor) wird eine Lösung mit einer Konzentration von 50 nMol/l in HBS (10 mMol/l HEPES, 150 mMol/l NaCl 3,4 mMol/l EDTA 0,05 % P20 pH 7,4) über den Sensorchip mit einer Flußrate von 5 ml/min geleitet.

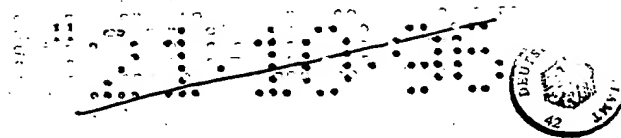
Danach werden die Antikörper in HBS zugegeben und die Bindung an die Peptide bei einer Flußrate von 10 µl/min verfolgt. Aus den Sensorgrammen werden die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und der Dissoziation der Bindung der Antikörper an die Peptide mit Hilfe einer Software des Herstellers (BIAevaluation 2.1, Pharmacia Biosensor) berechnet. Die Affinitätskonstante berechnet sich nach  $K_a = k_{on}/k_{off}$ . Die so ermittelten Werte der erfindungsgemäßen Antikörper an Bio-C-HA und BioN-HA als Antigene sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

anti-HA-mAb	Antigen	kon l/mol*s	koff 1/s	Ka l/mol
Babco	Bio-C-HA	9.5 E +3	1.0 E -3	9.3 E +6
12CA5	Bio-C-HA	2.3 E +4	2.6 E -4	9.2 E +7
R3F10	Bio-C-HA	5.9 E +5	4.8 E -5	1.2 E +10
R3A12	Bio-C-HA	1.7 E +5	5.4 E -4	3.1 E +8
R6D12	Bio-C-HA	4.0 E +5	7.6 E -5	5.2 E +9
Babco	Bio-N-HA	1.2 E +4	5.0 E -4	2.3 E +7
12CA5	Bio-N-HA	5.3 E +4	2.1 E -4	2.6 E +8
R3F10	Bio-N-HA	6.2 E +5	9.1 E -5	6.8 E +9
R3A12	Bio-N-HA	7.7 E +5	1.4 E -4	5.7 E +9
R6D12	Bio-N-HA	5.9 E +5	1.2 E -4	5.1 E +9

## Patentansprüche

1. Monoklonale Antikörper gegen das Epitop YPYDVPDYA, das aus dem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus abgeleitet ist, bzw. Fragmente hiervon, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Affinität  $> 10^8 \text{ M}^{-1}$  besitzen.
2. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Affinität von  $10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$  besitzen.
3. Monoklonale Antikörper nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie von Hybridomen produziert werden, die man durch Fusion der Myelomzellen Maus P3x63-Ag8.653 mit B-Lymphozyten aus Lou/C-Ratten erhält, wobei die Lou/C-Ratten mit einem HA-Peptid immunisiert wurden.
4. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Immunisierung mit einem an Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH) gekoppelten HA-Peptid erfolgt.
5. Monoklonale Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie vom Hybridom R 3A12, hinterlegt in der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen unter der Nr. DSM ACC2286 (08.10.1996), produziert werden.
6. Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man ein HA-Peptid synthetisiert und damit Kleinsäuger immunisiert, die B-Lymphozyten aus der Milz der Tiere gewinnt und mit Myelomzellen Maus P3x62-Ag8.653 fusioniert, die entstandenen Klone, die an ein HA-Peptid und an ein HA-Fusionsprotein binden, selektioniert und von diesen die Klone mit hoher Affinität auswählt und als Hybridzelllinien etabliert.



7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man als HA-Peptid Acetyl-YPYDVPDYAGSGSK( $\epsilon$ -Biotinoyl)-Amid oder Biotinoyl- $\epsilon$ -Aca-SGSGYPYDVPDYA-Amid einsetzt.
- 5 8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als HA-Fusionsprotein HA-getaggte Glutathion-S-Transferase einsetzt.
9. Verwendung von monoklonalen Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie zum Nachweis und zur Isolierung von nativem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus, von modifiziertem Hämagglutinin oder von HA-Fusionsproteinen eingesetzt werden.

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen das Epitop YPYDVPDYA, das  
5 aus dem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus abgeleitet ist und die zum Nach-  
weis und zur Isolierung von nativem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus, von  
modifiziertem Hämagglutinin oder von Hämagglutinin-Fusionsproteinen geeignet sind  
sowie eine Affinität  $> 10^8 \text{ M}^{-1}$ , insbesondere von  $10^9$  bis  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  aufweisen.

Abbildung 1

